

福井大学重点研究 「プロジェクト研究」

蛋白質 1 分子構造変化のリアルタイム追跡法の展開

研究代表者：老木 成稔（医学部医学科、教授）

電話：0776-61-8306、メールアドレス：oiki@u-fukui.ac.jp

共同研究者：今野 卓（医学部医学科、准教授）、清水 啓史（医学部医学科、助教）

岩本 真幸（医学部医学科、助教）

概 要	
<p>蛋白質の構造変化を捉えるユニークな方法として私達は 1 分子構造変化追跡法(DXT 法)を確立した。構造変化の軌跡をより長時間、より広範囲で、また時間分解能を上げるために、本法の技術的側面を根本的に考え直した。実験の精度を決めているのは、金ナノ結晶、高輝度放射光施設の特性、測定器の性能、による。一方、測定対象となるチャネル蛋白質に対する最適な変異型の選択や実験条件によっても実験精度は上がる。本年度は実験条件の可能な組み合わせを試行錯誤し検討していくことに費やされた。2つの大きな進歩があった。高輝度放射光施設の使用に関して共同研究が確立したことと、SPring-8（播磨）、ESRF（ヨーロッパ放射光施設、グルノーブル）および SLS（スイス放射光源、チューリッヒ近郊）での実験時間をほぼ希望通り利用できる予定がたったことである。</p>	
関連キーワード	蛋白質構造変化、1 分子測定、イオンチャネル、放射光、金ナノ結晶

研究の背景

蛋白質はその構造を変化させることで機能を発揮する。多くの蛋白質の立体構造が明らかになっているが、機能に関わる構造変化を捉えることは容易ではない。特に高精度で構造変化を明らかにするには、大量の蛋白質の平均像を追跡するだけでは重要な情報が失われてしまうことがある。蛋白質 1 分子ごとに構造変化を追跡することが、蛋白質の動態を明らかにする上で強力な手法となる。チャネル分子を対象とした場合、その機能に関しては 1 分子レベルでの測定が比較的容易で、膨大な情報が長年にわたって蓄積している。私達はチャネルの 1 分子測定法であるパッチクランプ法と脂質平面膜法を 20 年にわたって行ってきた。約 10 年前にチャネルの立体構造が明らかになり、構造変化の 1 分子測定が実現可能な実験の標的となってきた。しかし機能に対応する蛋白質構造の変化を捉える方法は乏しく、十分な精度を持ったものを開発する必要があった。私達は 7 年前に 1

分子 X 線計測法を導入し、サンプル調整、測定から解析にいたるまで、方法の全過程にわたってその確立に精力を投入してきた。これによって従来予想できなかった分子の振る舞いを捉えることに成功した (Cell 2008)。チャネル分子がイオン透過路を開閉するために、分子全体がねじれていることが初めて明らかになったのである。さらにこの構造変化は細胞質ドメインにも伝播していた。医学に直結する成果として、薬物作用機構について、従来の機能的測定から予想できない新しい作用様式を発見した。薬物は単にイオンの通り道を遮断するだけではなく、構造を固定するという発見であった。蛋白質の構造変化ダイナミクスの中に薬物作用機構を読み取るという新しい領域が開けたが、これは創薬の新しい方向性を打ち出したものといえる。

研究の目的

機能するチャネル蛋白質 1 分子の構造変化を高い空間的・時間的分解能で追跡することが本研究の目的である。チャネル分子がゲーティング（イオン透過路の開閉）に際して、数Åの程度の微小な構造変化を起こしているはずであるが、これを 1 分子レベルで、リアルタイムで捉える。大量のチャネル分子からの測定では分子構造の平均化した像しか観察できず、とくに構造変化と機能を密

接に関連付けるには 1 分子測定が不可欠である。

この方法自体、世界に先駆けた独自のものであるが、7 年間の試行錯誤を踏まえ、さらに方法論を発展させるためのノウハウやアイデアが蓄積しつつある。本研究では、従来から懸案の金ナノ結晶を改良し、測定器などの精度の改善を行う。これによって、現状の測定システムでは見えない運動領域や、速い構造変化を捉えたい。

研究の成果

本研究の 3 本の柱は、チャネル蛋白質の構造変化をラベルするための金ナノ結晶の作成、高輝度放射光施設使用時間の確保、測定機器の設定である。3 者ともに大きな進展があった。

金ナノ結晶は測定に適したものを作成するために、数箇所の研究グループとの協同研究を始めた。金ナノ結晶は溶液相や気相で成長させる。得られた金ナノ結晶は電子顕微鏡で形状、サイズとその分布を測定し、その結晶性を高輝度 X 線施設で確かめた。

高輝度放射光施設に関しては播磨の SPring-8 での実験を再開することができただけでなく、スイスの SLS、フランスの ESRF との協同研究の合意に至り、SLS ではすでに予備実験を開始した。そ

れぞれの施設は放射光の特性に差があり、各施設でどのビームラインを使用するかについて検討した。ESRF での実験は次年度早期に予定している。

測定機器については、スイス SLS の装置をテストし、驚異的に広範囲のシグナルを捉えることができ、しかも高感度であることが明らかになった。しかし時間分解能が低いという欠点があり、改良が望まれた。一方、SPring-8 では備えられた測定装置を使用して、感度・時間分解能などを検討した。その結果、希望するスペックを絞ることができ、新しい測定装置の購入を決定した。

実験の精度を決めるチャネル蛋白質の条件として、測定に適したアミノ酸変異を検討し、変異 KcsA カリウムチャネルを作成した。

特記事項・発表論文など

「特記事項」

高輝度放射光施設の使用に対する公募に応募し、世界の研究者間の厳しい競争の中、十分な使用時間を確保することが出来た。

「本研究に関わる発表論文」

Imai, Y.N., S. Ryu and S. Oiki: A Docking Model of Drug Binding to the Human Ether-à-go-go Potassium Channel guided by Tandem Dimer Mutant Patch-Clamp Data: A Synergic Approach. **J. Med. Chem.** In press.

Myokai, T., Ryu, S., Shimizu, H. & Oiki, S.: Topological Mapping of the Asymmetric Drug Binding to the HERG Potassium Channel By Use of Tandem Dimers. **Mol. Pharmacol.** 73: 1643-1651, 2008

Shimizu, H., Iwamoto, M., Konno, T., Nihei, A., Sasaki, Y.C. and Oiki, S.: Global Twisting Motion of Single Molecular KcsA Potassium Channel Upon Gating. **Cell** 132: 67-78, 2008.